

อรลัดดา เจือจันทร์ : การศึกษาคุณสมบัติ การโคลน การแสดงออก และการประยุกต์ใช้ของ
เอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสจากแบคทีเรีย (CHARACTERIZATION, CLONING,
EXPRESSION AND APPLICATION OF BACTERIAL BETA-GALACTOSIDASE)
อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.มณฑารพ ยมาภย์, 180 หน้า.

จากการคัดเลือกแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ อาทิเช่น *Pediococcus* spp. และ *Lactobacillus* spp. พบว่า *Bacillus licheniformis* DSM 13 เป็นสายพันธุ์แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสได้สูงสุด โดยเอนไซม์นี้มีลักษณะเป็นโมเลกุลคู่ สร้างจาก ยีน *lacA* (2055 bp) ซึ่งเมื่อถูกแปลงรหัสเป็นโปรตีน จะมีค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยการคำนวณทางทฤษฎีเท่ากับ 78.85 กิโลดาลตัน ยีน *lacA* นี้ถูกโคลนเข้าไปในพลาสมิด p10HisFLAG ทำให้ได้พลาสมิด pOJBilacA2 ซึ่งสามารถนำไปแสดงออกให้ได้จำนวนสูงในแบคทีเรีย *Escherichia coli* TOP10 จากนั้นเอนไซม์เบตา-กาแลคโตซิเดสที่ถูกสร้างขึ้นจากวิธีทางพันธุวิศวกรรมนี้ ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี affinity chromatography ด้วยคอลัมน์ Ni Sepharose 6 fast flow จนบริสุทธิ์แล้วจึงนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติด้านต่างๆ ซึ่งพบว่าเอนไซม์บริสุทธิ์ที่ได้มีค่า specific activity เท่ากับ 271.3 ยูนิตต่อมิลลิกรัม โปรตีน ค่าความเป็นกรดและอุณหภูมิที่เหมาะสมของเอนไซม์เบตา -กาแลคโตซิเดส คือที่ pH 6.5 และ 50 องศาเซลเซียส สำหรับการไฮโดรไลซิสทั้ง *o*-nitrophenyl β -D-galacto-pyranoside (*o*NPG) และ แลคโตส ส่วนค่า K_m ของแลคโตส และ *o*NPG มีค่าเท่ากับ 169.4 และ 13.7 mM ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่า เอนไซม์นี้ถูกยับยั้งอย่างแรงด้วยผลิตภัณฑ์ จากการไฮโดรไลซิส คือ กลูโคสและกาแลคโตส ส่วน monovalent ion (Na^+ และ K^+) ความเข้มข้น 1-100 mM และ divalent cation (Mg^{2+} , Mn^{2+} และ Ca^{2+}) ความเข้มข้น 1 mM สามารถกระตุ้นกิจกรรมเอนไซม์ได้เล็กน้อย ผลการศึกษาพบว่าเอนไซม์นี้มีประสิทธิภาพในการย่อยแลคโตสได้ดี อย่างไรก็ตาม สักยภาพของปฏิกิริยา transgalactosylation ของเอนไซม์นี้ในการผลิตกาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์ (GOS) ไม่สูงนัก คือ พบว่ามีการผลิตกาแลคโต-โอลิโกแซคคาไรด์น้อยกว่า 10% (w/w) ของปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เมื่อใช้แลคโตสที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

ONLADDA JUAJUN : CHARACTERIZATION, CLONING, EXPRESSION
AND APPLICATION OF BACTERIAL BETA-GALACTOSIDASE.

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. MONTAROP YAMABHAI, Ph.D.,
180 PP.

β -GALACTOSIDASE/ *Bacillus licheniformis* DSM 13/

TRANSGALACTOSYLATION / GALACTO-OLIGOSACCHARIDE

The screening of eight strains of bacteria, such as *Pediococcus* spp. and *Lactobacillus* spp. revealed that *Bacillus licheniformis* DSM 13 could produce the highest amount of β -galactosidase enzyme for lactose hydrolysis. The homodimeric β -galactosidase of *B. licheniformis* DSM 13 was encoded by *lacA* gene (2055 bp), with a translated protein sequence of a theoretical molecular mass of 78.85 kDa. When the *lacA* gene was cloned into p10HisFLAG vector, the recombinant plasmid (pOJB_{lilacA2}) was gained and could be over-expressed in *Escherichia coli* TOP10. The recombinant β -galactosidase could be purified by affinity chromatography using Ni Sepharose 6 fast flow column to become apparent homogeneity. The purified enzyme had a specific activity of 271.3 U/mg proteins. The optimal pH and temperature of β -galactosidase for both *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (*o*NPG) and lactose hydrolysis were 6.5 and 50°C, respectively. The K_m values for lactose and *o*NPG were 169.4 and 13.7 mM, respectively; it is strongly inhibited by the hydrolysis products, i.e. glucose and galactose. Monovalent ions (Na^+ and K^+) in the concentration range of 1-100 mM as well as di-valent metal cations (Mg^{2+} , Mn^{2+} , and Ca^{2+}) at the concentration of 1 mM slightly activated the enzyme. This enzyme could be used efficiently for lactose hydrolysis; however, the transgalactosylation potential of this

enzyme for the production of galacto-oligosaccharides (GOS) from lactose was found to be low, with less than 10% (w/w) of total sugars obtained, when the initial lactose concentration was 200 g/L.

School of Biotechnology

Academic Year 2009

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____